

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. April 2002 (04.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/27003 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/82**,
A01H 5/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08055

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Juli 2001 (12.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 47 286.9 20. September 2000 (20.09.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **SÜDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT**
[DE/DE]; Mannheim/Ochsenfurt, Maximilianstrasse 10,
68165 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KUNZ, Markwart**

[DE/DE]; Kernerstrasse 8, 67550 Worms (DE). **MATTES, Ralf** [DE/DE]; Friedrich-Zundel-Strasse 14, 70619 Stuttgart (DE). **MUNIR, Mohammad** [DE/DE]; Am Kinderbach 1, 67271 Kindenheim (DE). **VOGEL, Manfred** [DE/DE]; Am Höllpfad 1, 67271 Neuleiningen (DE).

(74) Anwälte: **SCHRELL, Andreas** usw.; Maybachstrasse 6A, 70469 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, BR, CA, IL, JP, US, ZA.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TRANSGENIC PLANTS WHICH PRODUCE ISOMALT

(54) Bezeichnung: ISOMALT PRODUZIERENDE TRANSGENE PFLANZE

(57) Abstract: The invention relates to a transgenic plant, which can produce isomaltulose, to a transgenic plant, which can produce 6-O- α -D-glucopyranosyl-D-sorbitol, to a transgenic plant, which can produce 1-O- α -D-glucopyranosyl-D-mannitol and to a transgenic plant, which can produce a mixture of 1,6-GPS and 1,1-GPM. The invention also relates to breeding and harvest material of these plants and to methods for producing said transgenic plants.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine transgene Pflanze, die Isomaltulose erzeugen kann, eine transgene Pflanze, die 6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-sorbit erzeugen kann, eine transgene Pflanze, die 1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-mannit erzeugen kann, eine transgene Pflanze, die ein Gemisch aus 1,6-GPS und 1,1-GPM erzeugen kann, Vermehrungs- und Erntematerial dieser Pflanzen sowie Verfahren zur Erzeugung dieser transgenen Pflanzen.



WO 02/27003 A1

-1-

Isomalt produzierende transgene Pflanze5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine transgene Pflanze, die Isomaltulose erzeugen kann, eine transgene Pflanze, die 6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-sorbit (im Folgenden 1,6-GPS) erzeugen kann, eine
10 transgene Pflanze, die 1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-mannit (im Folgenden 1,1-GPM) erzeugen kann, eine transgene Pflanze, die ein Gemisch aus 1,6-GPS und 1,1-GPM erzeugen kann, Vermehrungs- und Erntematerial dieser Pflanzen sowie Verfahren zur Erzeugung
15 dieser transgenen Pflanzen.

Aus der DE 44 14 185 C1 sind Saccharose-Isomerasen (z.B. aus den Mikroorganismen Protaminobacter rubrum und Erwinia rhapontici) bekannt, die die glycosidische Bindung zwischen den Monosaccharideinheiten von Saccharose isomerisieren und dadurch
20 die Umwandlung von Saccharose zu Isomaltulose und Trehalulose katalysieren können. In dieser Druckschrift werden die die Saccharose-Isomerase codierenden DNA-Sequenzen sowie damit transformierte
25 Zellen beschrieben.

Auch Verfahren zur Herstellung von Palatinit® (auch Isomalt oder hydrierte Isomaltulose genannt), einem nahezu äquimolarem Gemisch aus 1,6-GPS und 1,1-GPM, sowie seiner Einzelkomponenten 1,1-GPM und
30 1,6-GPS aus Saccharose sind bekannt, die eine enzymatische Umwandlung von Saccharose zu Isomaltulose

- 2 -

und anschließend eine chemische Hydrierung der erhaltenen Isomaltulose zu den beiden Stereoisomeren 1,6-GPS und 1,1-GPM umfassen. So offenbart Schiweck (alimenta 19 (1980), 5-16) ein Verfahren zur Gewinnung von Palatinit®, wobei das Verfahren die enzymatische Umsetzung von Saccharose zu Isomaltulose und die anschließende Hydrierung der isolierten Isomaltulose an Raney-Nickel-Katalysatoren umfasst. Dabei erfolgt die Umwandlung von Saccharose zu Isomaltulose mittels des Mikroorganismus Protaminobacter rubrum und die auf diesem Weg gewonnene Isomaltulose wird in Gegenwart von Raney-Nickel-Katalysatoren durch Hydrierung zu 1,6-GPS und 1,1-GPM umgewandelt und anschließend mittels Verdampfungs- und Kühlungskristallisationsverfahren angereichert.

In der EP 0 625 578 B1 werden Verfahren zur Gewinnung von 1,1-GPM und 1,6-GPS enthaltenden Zuckeralkoholgemischen beschrieben, bei denen zunächst Saccharose enzymatisch in ein Isomaltulose- und Trehalulose-haltiges Gemisch umgewandelt und das dabei erhaltene Produkt katalytisch zu einem 1,1-GPM, 1,6-GPS und 1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-sorbit (1,1-GPS) enthaltenden Gemisch hydriert wird.

In der DE 195 23 008 A1 wird ein Verfahren zur Herstellung von Gemischen aus 1,1-GPM und 1,6-GPS offenbart, das die Hydrierung von Isomaltulose bei Drücken von unter 50 Atmosphären unter Verwendung von Ruthenium, Nickel oder deren Mischungen enthaltenden Katalysatoren umfasst.

- 3 -

In der DE 197 01 439 A1 werden Verfahren zur Hydrierung von Isomaltulose mittels eines trägergebundenen Nickelkatalysators offenbart, wobei Gemische aus 1,6-GPS und 1,1-GPM erhalten werden.

5 Die DE 197 05 664 A1 offenbart Verfahren zur Herstellung von 1,6-GPS- oder 1,1-GPM- angereicherten Gemischen aus hydrierter Isomaltulose. Ein in dieser Druckschrift beschriebenes Verfahren umfasst die Herstellung 1,6-GPS- und/oder 1,1-GPM-ange-
10 reicherter Gemische aus hydrierter Isomaltulose oder aus hydrierter Isomaltulose enthaltenden Gemischen. Mittels Aufkonzentrierung einer 1,6-GPS-angereicherten Mutterlauge unter bestimmten Bedingungen und Kühlungskristallisation kann unter Ver-
15 wendung dieses Verfahrens 1,6-GPS in reiner Form hergestellt werden.

Aus der deutschen Patentanmeldung DE 199 63 126.3 ist eine Sorbit-Dehydrogenase aus einem Mikroorganismus der Gattung Gluconobacter bekannt, mit deren
20 Hilfe Isomaltulose gezielt zu 1,6-GPS' umgewandelt werden kann.

Schließlich ist aus einem Mikroorganismus der Gattung Pseudomonas eine Mannit-Dehydrogenase isoliert worden (Brünker et al., Biochimica et Biophysica
25 Acta, 1351 (1997), 157-167), die Isomaltulose zu 1,1-GPM umwandeln kann.

Die Verfahren nach dem Stand der Technik werden hinsichtlich der Gewinnung von Palatinit®, seiner Einzelbestandteile und Vorstufen vor allem aus den
30 folgenden Gründen als nachteilig angesehen.

- 4 -

Erstens ist es bei nahezu allen Verfahren zur Herstellung der genannten Stoffe erforderlich, zunächst Saccharose als Ausgangsstoff mittels physikalisch-chemischer Verfahren aus zum Beispiel
5 Zuckerrüben zu isolieren und für die nachfolgenden Verfahrensschritte aufzureinigen. Zweitens umfasst dann die weitere Aufarbeitung von Saccharose zu 1,6-GPS und/oder 1,1-GPM weitere komplizierte Verfahrensabfolgen, wobei verschiedene physikalische,
10 chemische und/oder biologische Verfahren in verschiedenen Reaktoren zum Einsatz kommen müssen. Um gezielt 1,6-GPS aus Saccharose zu gewinnen, sind beispielsweise mindestens zwei separate enzymatische Umsetzungen erforderlich, in deren Verlauf
15 im Allgemeinen aufwändige Aufreinigungsschritte durchgeführt werden müssen. Ähnliches gilt für die Herstellung von 1,1-GPM und Isomalt. So müssen unter anderem zur Gewinnung von 1,1-GPM aus Saccharose mindestens eine enzymatische Umsetzung, eine
20 chemische Hydrierung unter Verwendung von Katalysatoren; speziellen Hydrierreaktoren und technischem Wasserstoff sowie nachfolgende Trennschritte zur Isolierung von 1,1-GPM aus dem zuvor erhaltenen Gemisch aus 1,1-GPM und 1,6-GPS durchgeführt werden.

25 Ein erheblicher Nachteil der im Stand der Technik bekannten Verfahren besteht also in der Notwendigkeit, unter einem erheblichen technischen Aufwand mehrere Verfahrensschritte durchzuführen. Da die dabei gewonnenen Produkte zur Verwendung in der Lebensmittelindustrie bestimmt sind, müssen die Ver-
30 fahrensgänge darüber hinaus so ausgewählt werden, dass keine toxischen Substanzen, z.B. aus den Katalysatoren, in die Endprodukte gelangen. Dazu sind

- 5 -

weitere Aufreinigungsschritte erforderlich, die häufig dazu führen, dass die Ausbeuten an Endprodukten nicht zufriedenstellend sind.

Das der vorliegenden Erfindung zu Grunde liegende technische Problem besteht also darin, Verfahren und Mittel zu deren Durchführung bereit zu stellen, die eine einfache, kostengünstige und selektive Gewinnung von Isomaltulose und ihren Hydrierprodukten, insbesondere von 1,6-GPS, von 1,1-GPM oder von diese umfassenden Gemischen erlauben.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem durch Bereitstellung transgener Pflanzen, insbesondere transgener Kartoffeln oder transgener Zuckerrüben, die in mindestens einer ihrer Zellen aus in der Pflanze gebildeter Saccharose Isomaltulose erzeugen können. Insbesondere betrifft die Erfindung eine vorstehend skizzierte Pflanze, die neben ihrer Fähigkeit, aus in ihr gebildeter Saccharose Isomaltulose zu erzeugen überdies die Fähigkeit besitzt, aus dieser Isomaltulose 1,6-GPS und/oder 1,1-GPM zu erzeugen. Eine derartige Pflanze stellt in überraschender und vorteilhafter Weise ein in vivo System zur Erzeugung von Palatin®[®], seiner Einzelkomponenten, sowie des Vorläufers Isomaltulose bereit, welches am Ort der Entstehung des Eduktes, also der Saccharose, eine unmittelbare Erzeugung der gewünschten Endprodukte erlaubt. Aufwändige Isolier-, Aufreinigungs- und/oder Hydrierverfahren werden hier vermieden. Zudem kommen keinerlei toxische Substanzen zum Einsatz.

- 6 -

Die Erfindung löst das ihr zugrunde liegende Problem auch durch die Bereitstellung von Verfahren zur Herstellung der vorgenannten Pflanzen.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft also eine transgene Pflanze, insbesondere eine transgene Zuckerrübe oder Kartoffel, die in der Lage ist, in mindestens einer ihrer Zellen aus Saccharose Isomaltulose zu erzeugen. Eine derartige Pflanze stellt einen wertvollen Rohstoff für die Herstellung von Palatinit® bereit, welches zum Beispiel nach Isolierung der Isomaltulose aus der Pflanze durch chemische Hydrierung erhalten werden kann, wobei selbstverständlich auch von 1:1-Verhältnis von 1,1-GPM zu 1,6-GPS abweichende Mischungen von 1,1-GPM zu 1,6-GPS hergestellt werden können. Eine derartige Pflanze kann auch zum Ausgangspunkt weiterer gentechnischer Manipulationen gemacht werden, die letztendlich zur Herstellung eines vollständigen Stoffwechselweges von Saccharose zu Palatinit® oder seiner Einzelkomponenten führt.

Im Zusammenhang mit der Erfindung wird unter einer transgenen Pflanze, die aus in der Pflanze gebildeter Saccharose Isomaltulose erzeugen kann, eine Pflanze verstanden, die eine stabil integrierte und in ihr exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer Saccharose-Isomerase codiert. Eine Saccharose-Isomerase katalysiert die Isomerisierung von Saccharose zu Isomaltulose, wobei die $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ glykosidische Bindung zwischen Glucose und Fructose in der Saccharose in eine andere glykosidische Bindung, insbesondere in eine $\alpha 1 \rightarrow \beta 6$ Bindung

- 7 -

überführt wird. Erfindungsgemäß geeignete Nucleotidsequenzen, die die Aktivität einer Saccharose-Isomerase codieren, sind unter anderem aus Mikroorganismen der Gattung Protaminobacter, Erwinia, Ser-
5 ratia, Leuconostoc, Pseudomonas, Agrobacterium oder Klebsiella bekannt. Die DE 44 14 185 C1 offenbart die Isolierung und Clonierung von Saccharose-Isomerase codierenden Nucleotidsequenzen aus den Mikroorganismen Protaminobacter rubrum und Erwinia
10 rhapontici, wobei das genannte Dokument hinsichtlich der Beschreibung und Bereitstellung der DNA-Sequenzen vollständig in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Lehre mit einbezogen wird und wobei für diese DNA-Sequenzen im erfindungsgemäßen Kon-
15 text Schutz begehrt wird.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine transgene Pflanze, insbesondere eine transgene Zuckerrübe oder Kartoffel, die in mindestens einer ihrer Zel-
20 len aus Saccharose Isomaltulose und aus der so gebildeten Isomaltulose 1,6-GPS erzeugen kann.

Im Zusammenhang mit der Erfindung wird unter einer transgenen Pflanze, die aus der gebildeten Isomaltulose 1,6-GPS erzeugen kann, eine Pflanze verstan-
25 den, die eine stabil integrierte und in ihr exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer Saccharose-Isomerase codiert, und somit aus Saccharose Isomaltulose erzeugen kann, und die außerdem eine stabil integrierte und exprimierbare
30 Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer Sorbit-Dehydrogenase codiert. Eine Sorbit-Dehydrogenase-Aktivität reduziert Isomaltulose spezifisch

- 8 -

zu 1,6-GPS. In der deutschen Patentanmeldung DE 199 63 126.3 ist eine erfindungsgemäß geeignete Sorbit-Dehydrogenase aus dem Mikroorganismus *Glucobacter suboxidans* offenbart, wobei das genannte
5 Dokument hinsichtlich der Beschreibung und Bereitstellung der DNA-Sequenz vollständig in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Lehre mit einbezogen wird und wobei für diese DNA-Sequenz im erfindungsgemäßen Kontext Schutz begehrt wird.

10 Eine weitere besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine transgene Pflanze, insbesondere eine transgene Zuckerrübe oder Kartoffel, die in mindestens einer ihrer Zellen aus der in der Pflanze gebildeten Saccharose
15 Isomaltulose und aus der so gebildeten Isomaltulose 1,1-GPM erzeugen kann.

Im Zusammenhang mit der Erfindung wird unter einer transgenen Pflanze, die aus der gebildeten Isomaltulose 1,1-GPM erzeugen kann, eine Pflanze verstanden,
20 die eine stabil integrierte und in ihr exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer Saccharose-Isomerase codiert, und somit aus Saccharose Isomaltulose bilden kann, und die außerdem eine stabil integrierte und exprimierbare
25 Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer Mannit-Dehydrogenase codiert. Eine Mannit-Dehydrogenase Aktivität reduziert Isomaltulose spezifisch zu 1,1-GPM. Brünker et al. beschreiben in *Biochimica et Biophysica Acta*, 1351 (1997), 157-167, eine
30 erfindungsgemäß geeignete Mannit-Dehydrogenase aus dem Mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106, wobei das genannte Dokument hinsichtlich der

Beschreibung und Bereitstellung der DNA-Sequenz vollständig in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Lehre mit einbezogen wird und wobei für diese DNA-Sequenz im erfindungsgemäßen Kontext Schutz
5 begehrt wird.

Eine weitere besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft eine transgene Pflanze, insbesondere eine transgene Zuckerrübe oder Kartoffel, die in mindestens einer ihrer Zellen aus der in der
10 Pflanze gebildeten Saccharose Isomaltulose und aus der so gebildeten Isomaltulose ein Gemisch aus 1,6-GPS und 1,1-GPM erzeugen kann, zum Beispiel ein 1:1 Gemisch.

Im Zusammenhang mit der Erfindung wird unter einer
15 transgenen Pflanze, die aus der gebildeten Isomaltulose 1,6-GPS und 1,1-GPM erzeugen kann, eine Pflanze verstanden, die eine stabil integrierte und in ihr exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer Saccharose-Isomerase codiert,
20 und somit aus Saccharose Isomaltulose bilden kann und die außerdem entweder eine stabil integrierte und exprimierbare Nucleotidsequenz, die die Aktivität einer Sorbit-Dehydrogenase codiert, und eine stabil integrierte und exprimierbare Nucleo-
25 tidsequenz enthält, die die Aktivität einer Mannit-Dehydrogenase codiert, oder eine stabil integrierte und exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer unspezifisch hydrierenden Polyoldehydrogenase codiert.

30 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine transgene Pflanze, insbeson-

- 10 -

dere eine Zuckerrübe oder Kartoffel, die in mindestens einer ihrer Zellen eine stabil integrierte und exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer Sorbit-Dehydrogenase codiert.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung eine transgene Pflanze, insbesondere eine Zuckerrübe, bereit, die in mindestens einer ihrer Zellen eine stabil integrierte und exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer Mannit-Dehydrogenase codiert. Die
10 beiden vorgenannten Pflanzen sind vorteilhaft insofern, als dass sie die Bereitstellung der Enzyme Sorbit-Dehydrogenase und Mannit-Dehydrogenase erlauben. Überdies können die genannten Pflanzen als
15 Ausgangsmaterial für die Herstellung von transgenen Pflanzen dienen, die aus Saccharose Palatinit® erzeugen, wobei in die genannten Pflanzen Saccharose-Isomerase codierenden Nucleotidsequenzen eingeführt werden müssen.
- 20 Bei den transgenen Pflanzen kann es sich um Pflanzen der verschiedensten Arten, Gattungen, Familien, Ordnungen und Klassen handeln, das heißt sowohl Monocotyle als auch dicotyle Pflanzen, ebenso wie Algen, Moose, Farne oder Gymnospermae. Transgene
25 Pflanzen können auch Kalli, Pflanzenzellkulturen, sowie Teile, Organe, Gewebe, Ernte- oder Vermehrungsmaterialien davon umfassen.

- Die Erfindung sieht insbesondere vor, dass die transgene Pflanze eine Nutzpflanze ist, insbesondere eine Nutzpflanze, die in ihrem Speicherorgan
30 Saccharose produzieren kann, wie zum Beispiel

- 11 -

Zuckerrohr oder Zuckerrübe. Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterialien und Ernteprodukte der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Blüten, Früchte, Speicherorgane, Rüben, Stengel, Samen, Knollen, Wurzeln, Blätter, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge etc.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Ausdruck "in mindestens einer ihrer Zellen", dass eine transgene Pflanze mindestens eine Zelle, vorzugsweise jedoch eine Vielzahl von Zellen enthält/enthalten, die eine oder mehrere stabil integrierte Nucleotidsequenzen enthalten, die die Aktivität einer Saccharose-Isomerase und/oder die Aktivität einer Sorbit-Dehydrogenase und/oder die Aktivität einer Mannit-Dehydrogenase codieren. Bei den Zellen handelt es sich vorzugsweise um Zellen, in denen Saccharose gebildet oder gespeichert wird. Im Falle einer transgenen Zuckerrübe handelt es sich also bevorzugt um Zellen des Zuckerrübenspeicherorgans, das heißt um Zellen der Rübe, während es sich im Falle einer transgenen Kartoffel bevorzugt um Zellen der Knolle handelt.

Die Nucleotidsequenz kann vorzugsweise im Zellkern aber auch im Plastidengenom oder im mitochondrialen Genom integriert sein, und zwar vorzugsweise so, dass sie stabil in die nächste Generation vererbt wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Zellen, die die vorstehend genannten Nucleotidsequenzen enthalten, sowie transgene Pflanzen, die von derartigen Zellen abstammen.

Derartige Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Zellen dadurch unterscheiden, dass sie jeweils eine oder mehrere der vorstehend genannten codierenden Nucleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommen, oder dass die vorstehend genannten codierenden Nucleotidsequenzen an einem Ort des Genoms integriert sind, an dem sie natürlicherweise nicht vorkommen, oder dass die vorstehend genannten codierenden Nucleotidsequenzen in einer anderen als der natürlichen Kopiezahl vorliegen. Zudem unterscheiden sich die vorstehend beschriebenen Pflanzen durch die erfindungsgemäß bewirkten Stoffwechselaktivitäten und die Expression der genannten Enzyme. Die Erfindung stellt in vorteilhafter Weise derartige Pflanzen bereit, wobei deren Wüchsigkeit, Phänotyp und/oder Kulturbedingungen denen einer Wildtyppflanze vollständig gleichen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Ausdruck "stabil integrierte und exprimierbare Nucleotidsequenz", dass eine Nucleotidsequenz mit Nucleinsäure-Elementen verknüpft ist, die eine stabile Integration dieser Nucleotidsequenz in das Genom einer Pflanze gestatten, so dass die integrierte Nucleotidsequenz gemeinsam mit den natürlicherweise vorhandenen Genombestandteilen der Pflanzenzelle repliziert wird, sowie mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Transkription der Nucleotidsequenz und die anschließende Expression des von der Nucleotidsequenz codierten Produktes gewährleisten.

Zur Expression der vorstehend genannten Nucleotidsequenz in pflanzlichen Zellen, insbesondere in sense-Orientierung, werden die codierenden Bereiche dieser Nucleotidsequenzen in bevorzugter Ausführungsform mit regulatorischen Elementen verknüpft. 5 Dazu zählen insbesondere Promotoren, die die Transkription in Pflanzenzellen gewährleisten. Zur Expression der vorstehend genannten Nucleotidsequenzen kommen prinzipiell sowohl homologe als auch 10 heterologe Promotoren in Betracht. Es kann sich dabei um Promotoren handeln, die eine konstitutive Expression bewirken oder um Promotoren, die nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder nur zu einem 15 durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiv sind. Außerdem werden die vorstehend genannten Nucleotidsequenzen in bevorzugter Ausführungsform mit einer Terminationssequenz verknüpft, wodurch eine korrekte Transkriptions-Beendigung und eine 20 Anlagerung eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript bewirkt werden. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (Gielen et al., EMBO J., 8 (1989), 23-29).

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Expression der die enzymatischen Aktivitäten codierenden Nucleotidsequenzen dadurch erreicht, dass diese Nucleotidsequenzen unter der Kontrolle gewebe- oder organspezifischer, insbesondere speicherorganspezifischer Promotoren, 25 in mindestens einer Pflanzenzelle exprimiert werden. 30

- 14 -

Gewebespezifische Promotoren zur Expression der die enzymatischen Aktivitäten codierenden Nucleotidsequenzen in Samengewebe sind zum Beispiel der Vicilin-Promotor aus *Pisum sativum* (Newbigin et al., *Planta*, 180 (1990), 461-470). In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sieht die Erfindung vor, zur Expression der vorstehend genannten Nucleotidsequenzen in der Epidermis und dem Parenchym von sogenannten Sink-Organen beispielsweise den Arabidopsis-Promotor AtAAP1 (Expression in Endosperm und während früher Embryonalentwicklung) oder AtAAP2 (Expression in Phloem des Funiculus) (Hirner et al., *Plant J.*, 14 (1998), 535-544) zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, die die enzymatischen Aktivitäten codierenden Nucleotidsequenzen in den Pflanzenorganen zu exprimieren, die große Mengen an Saccharose speichern. Dazu zählen beispielsweise die Rübe der Zuckerrübe, der Stamm vom Zuckerrohr oder die Knolle der AGPase-antisense-Linie 93 der Kartoffel, der sogenannten „Saccharosekartoffel“ (Müller-Röber et al., *Mol. Gen. Genet.*, 224 (1990), 136-146). Die Expression der die enzymatischen Aktivitäten codierenden Nucleotidsequenzen in solchen Organen kann beispielsweise erreicht werden, indem der B33-Promotor des B33-Gens aus Kartoffeln verwendet wird (Rocha-Sosa et al., *EMBO J.*, 8 (1988), 23-29).

In weiteren Ausführungsformen der Erfindung kann vorgesehen sein, konstitutiv exprimierende Promotoren wie den CaMV 35S-Promotor, den geleitzellenspezifischen rolC-Promotor aus *Agrobacterium* oder den

- 15 -

Enhanced PMA4-Promotor (Morian et al., Plant J., 19 (1999), 31-41) einzusetzen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, in denen die enzymatischen Aktivitäten codierenden Nucleotidsequenzen im Leseraster an eine Signalsequenz fusioniert sind, welche ein Signalpeptid zur Aufnahme der enzymatischen Aktivitäten aufweisenden Genprodukte in das endoplasmatische Reticulum einer eukaryontischen Zelle codiert. Die Erfindung sieht also vor, dass die Nucleotidsequenzen mit Signalsequenzen versehen werden können, die eine Lokalisation der Genprodukte in bestimmten Kompartimenten der Zelle erlauben. So kommen insbesondere Signalsequenzen in Betracht, die Signalpeptide codieren, welche zur Aufnahme von Proteinen in das endoplasmatische Reticulum führen und die sich dadurch nachweisen lassen, dass sie zwar in den Vorläuferproteinen, nicht jedoch in prozessierten, reifen Proteinen nachweisbar sind. Bekanntermaßen werden nämlich die Signalpeptide während der Aufnahme in das endoplasmatische Reticulum proteolytisch entfernt. So kann in einer Ausführungsform der Erfindung vorgesehen sein, ein Signalpeptid wie zum Beispiel die verkürzte N-terminale Sequenz des Proteinase-inhibitors PI II aus Kartoffel (Keil et al., Nucl. Acids Res., 14 (1986), 5641-5650; Schaewen et al., EMBO Journal, 9 (1990), 3033-3044) zu verwenden, wodurch eine Aufnahme des Genprodukts in das endoplasmatische Retikulum mit anschließender Sekretion in den apoplastischen Raum erreicht wird. Selbstverständlich können erfindungsgemäß auch andere Signalsequenzen verwendet werden.

- 16 -

In einer weiteren Ausführungsform sieht die Erfindung vor, dass die die enzymatischen Aktivitäten codierenden Nucleotidsequenzen an eine Signalsequenz fusioniert sind, welche ein Signalpeptid zur Aufnahme ins endoplasmatische Reticulum einer eukaryontischen Zelle, insbesondere einer Pflanzenzelle, und zur Weiterleitung in die Vakuole codiert. Eine vakuoläre Lokalisation der Genprodukte ist besonders vorteilhaft. Erfindungsgemäß können beispielsweise Signalpeptide zur vakuolären Lokalisation von Lektin aus Gerste verwendet werden (Raikhel und Lernér, Dev. Genet., 12 (1991), 255-260), 43 Aminosäuren im aminoterminalen Bereich des reifen Phytohämagglutinins der Bohne codierende Signalsequenzen (Tague et al., Plant Cell, 2 (1990), 533-546) und Signalsequenzen aus einem Patatingen aus Kartoffel.

Erfindungsgemäß ist besonders bevorzugt, zur Lokalisation der Genprodukte in der Vakuole eine Signalsequenz des Patatin-B33-Gens zu verwenden, insbesondere eine Signalsequenz, die die 23 aminoterminalen Aminosäuren des Propeptids codiert (Rosahl et al., Mol. Gen. Genet., 203 (1986), 214-220), das heißt also die Nucleotide 736 bis 804. Diese Sequenz lässt sich sowohl als Fragment aus genomischer DNA der Kartoffel als auch aus der cDNA des B33-Gens gewinnen. Die Fusion der erweiterten B33-Signalsequenz mit den codierenden Nucleotidsequenzen führt zur Aufnahme von deren Genprodukten in die Vakuole.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die die enzymati-

- 17 -

schen Aktivitäten codierenden Nucleotidsequenzen nicht mit einer Signalsequenz fusioniert sind, so dass die exprimierten Genprodukte im Cytosol verbleiben.

- 5 Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung der vorgenannten transgenen Pflanzen, umfassend die Transformation einer oder mehrerer Pflanzenzellen mit einem Vektor, insbesondere einem Plasmid, der/ das eine oder mehrere Nucleotidsequenz(en) ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
10 einer die Aktivität einer Saccharose-Isomerase codierenden Nucleotidsequenz, einer die Aktivität einer Sorbit-Dehydrogenase codierenden Nucleotidsequenz und einer die Aktivität einer Mannit-Dehydrogenase codierenden Nucleotidsequenz enthält, die
15 Integration der in diesem Vektor oder Plasmid enthaltenen codierenden Nucleotidsequenz(en) in das Genom der transformierten Zelle(n), gegebenenfalls unter Einschluss von dessen/deren Signalsequenzen und/oder regulatorischen Elementen und die Regeneration der Pflanzenzelle(n) zu intakten, fruchtbaren transformierten Pflanzen, die Sorbit-Dehydrogenase, Mannit-Dehydrogenase und/oder Saccharose-Isomerase erzeugen.
- 20
- 25 Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Verfahren zur Verfügung. Bei vielen Verfahren ist es erforderlich, dass die einzuführenden Nucleotidsequenzen in Clonierungs- und oder Expressionsvektoren vorliegen. Bei Vektoren handelt es sich prinzipiell um
30 Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen, Shuttle-Vektoren und andere in der Gentechnik üblichen Vek-

- 18 -

toren. Vektoren können noch andere Funktionseinheiten besitzen, die den Vektor in einem Wirtsorganismus stabilisieren und/oder dessen Replikation ermöglichen. Vektoren können auch regulatorische Elemente enthalten, mit denen die enthaltene Nucleotidsequenz funktionell verbunden ist und die die Expression der Nucleotidsequenz in einem Wirtsorganismus gestatten. Derartige regulatorische Einheiten können Promotoren, Enhancer, Operatoren und/oder Transkriptionsterminationssignale sein. Vektoren enthalten darüber hinaus häufig Marker-Gene, die eine Selektion der sie enthaltenden Wirtsorganismen erlauben, wie zum Beispiel Antibiotika-Resistenzgene.

15 Verfahren zur Einführung von DNA in Pflanzenzellen umfassen Transformationen pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Protoplastenfusion, die Mikroinjektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten. Bei den Verfahren der Mikroinjektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide, wie zum Beispiel pUC-Derivate verwendet werden. Wenn aus derartig transformierten Zellen jedoch ganze Pflanzen regeneriert werden sollen, sollte ein selektierbarer Marker

25
30 vorhanden sein.

In Abhängigkeit von dem verwendeten Verfahren zur Einführung codierender Nucleotidsequenzen in die

Pflanzenzellen kann es erforderlich sein, dass der Vektor weitere DNA-Sequenzen enthält. Werden beispielsweise das Ti- oder Ri-Plasmid zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet, ist es erforderlich, dass zumindest die rechte Bordersequenz, häufig jedoch die rechte und die linke Bordersequenz der Ti- und Ri-Plasmid-T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden ist. Bei Verwendung von *Agrobacterium* zur Transformation muss die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Auf Grund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, können intermediäre Vektoren durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid von *Agrobacterien* integriert werden. Diese enthalten außerdem die für den Transfer der T-DNA erforderliche vir-Region. Intermediäre Vektoren können sich nicht in *Agrobacterien* replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden. Im Gegensatz dazu können sich binäre Vektoren sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobacterien* replizieren. Sie enthalten ein Gen für einen Selektionsmarker und einen Linker oder Polylinker, der von der rechten und linken T-DNA-Borderregion eingerahmt wird. Binäre Vektoren lassen sich direkt in *Agrobacterien* transformieren (Holsters et al., Mol. Gen. Genet., 163 (1978), 181-187). Das als Wirtszelle dienende *Agrobacterium* soll ein Plasmid, welches eine vir-Region trägt, enthalten. Dieser vir-Bereich ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Das auf diese Weise transformierte *Agrobacterium* wird zur Transformation von Pflanzenzellen

- 20 - ..

- verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist unter anderem beschrieben in EP-A-120 516; Hoekema: The Binary Plant Vector System, Offsetdruckerei Kanters. B. V., Alblasterdam (1985), Kapitel V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4,1-46, und An et al., EMBO J., 4 (1985), 277-287). Um DNA in die Pflanzenzelle zu transferieren, können Pflanzenexplantate mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes 5 kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial, wie zum Beispiel Blattstücken, Stengelabschnitten, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder in Suspension kultivierten Pflanzenzellen, können dann in einem geeigneten Medium, das Anti- 10 biotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthält, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Ein bevorzugtes Verfahren zur Transformation von Rübenzellen mittels Agrobacterium tumefaciens ist in EP 0 517 833 B1 offenbart.
- 20 Andere Möglichkeiten zur Einführung von Fremd-DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder mittels Protoplastentransformation sind unter anderem in Willmitzer, L., Transgenic plants, In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise 25 (Hersg. H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler) Band 2 (1993), 627-659, VCH Weinheim New York Basel Cambridge, offenbart. Alternative Systeme zur Transformation von monocotylen Pflanzen sind die elektrisch oder chemisch induzierte DNA-Aufnahme in 30 Protoplasten, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Makroinjektion von DNA in Blütenstände, die Mikroinjektion von DNA in Mikrosporen und Pro-Embryonen, die DNA-Aufnahme durch

- 21 -

keimende Pollen und die DNA-Aufnahme in Embryonen durch Quellung (Potrykos, *Physiol. Plant* (1990), 269-273). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass auch monocotyle Pflanzen mit Hilfe von Vektoren auf der Basis von *Agrobacterium* transformiert werden können (Chan et al., *Plant Mol. Biol.*, 22 (1993), 491-506; Hiei et al., *Plant J.*, 6 (1994), 271-282; Bytebier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1987), 5345-5349; Raineri et al., *Bio/Technology*, 8 (1990), 33-38; Gould et al., *Plant. Physiol.*, 95 (1991), 426-434; Mooney et al., *Plant, Cell Tiss. & Org. Cult.*, 25 (1991), 209-218; Li et al., *Plant Mol. Biol.*, 20 (1992), 1037-1048). Für verschiedene Getreidearten sind einige der vorstehend genannten Transformationssysteme etabliert worden, wie zum Beispiel die Elektroporation von Geweben, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer durch Partikelbeschuss in regenerierbare Gewebe und Zellen (Jähne et al., *Euphytica*, 85 (1995), 35-44). Die Transformation von Weizen ist von Maheshwari et al., *Critical Reviews in Plant Science*, 14(2) (1995), 149-178, und die Transformation von Mais ist von Brettschneider et al., *Theor. Appl. Genet.*, 94 (1997), 737-748, und Ishida et al., *Nature Biotechnology*, 14 (1996), 745-750, beschrieben worden.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Figuren und Beispiele erläutert. Die Figuren zeigen:

Figur 1 eine Restriktionskarte des Plasmids pHWG279.1, das ein etwa 1,7 kb großes HindIII-Fragment mit der Saccharose-

- 22 -

Isomerase codierenden Sequenz (smuA*) im Vektor pBR322 enthält,

Figur 2 eine Restriktionskarte des Plasmids pHWG469, das das native Gen der Sorbit-Dehydrogenase (sdh) aus Gluconobacter su-
boxidans im Vektor pBR322 enthält.

Beispiel 1:

Herstellung von Vektoren, die eine Saccharose-Isomerase codierende Nucleotidsequenz enthalten

Es wurde eine Reihe von Konstrukten hergestellt, die in einem binären Vektor jeweils einen in Pflanzen exprimierbaren Promotor, jeweils die Saccharose-Isomerase codierende Nucleotidsequenz aus *Pro-
taminobacter rubrum* und jeweils das Polyadenylierungssignal der T-DNA-Octopine-Synthase (Gielen et al., 1984) enthielten. Die codierende Nucleotidsequenz wurde entweder mit der Signalsequenz des Patatin-Gens der Kartoffel (Rosahl et al., Mol. Gen. Genet., 203 (1986), 214-220) fusioniert, die eine vakuoläre Lokalisation des Genprodukts bewirkt, oder ohne eine vakuoläre Target-Sequenz verwendet, um eine Expression im Cytosol der jeweiligen Pflanzenzelle zu erreichen. Als Promotor wurden sowohl der CaMV 35 S-Promotor als auch der Promotor des Patatin-Gens B33 der Kartoffel (Rocha-Sosa et al., EMBO J., 8 (1989), 23-29) verwendet, mit dem sich eine organspezifische Expression in der Knolle der Kartoffel und in der Speicherrübe der Zuckerrübe erreichen lässt. Im Fall der Kartoffel wurde der

- 23 -

binäre Vektor pBinB33-Hyg (Becker, Nucl. Acids Res., 18 (1990), 203) verwendet, der bereits den B33-Promotor und das Polyadenylierungssignal enthält und außerdem das Hyg-Resistenzgen als Marker

5 enthält. Im Fall der Zuckerrübe wurde der binäre Vektor pGA492 (An, Plant Physiol., 81 (1986), 86-91) verwendet, der ein Kanamycin-Resistenzgen besitzt. Mit den erhaltenen Plasmiden wurden Agrobakterien transformiert. Die transformierten Agrobakterien

10 wurden entweder zur Transformation der Kartoffel oder der Zuckerrübe verwendet. Im Folgenden wird die Konstruktion des Plasmids UL8-19 beschrieben, bei dem die Saccharose-Isomerase codierende Sequenz am 5'-Ende „in frame“ mit dem Signalpeptid

15 des Patatin-Gens und am 3'-Ende mit dem Polyadenylierungssignal der Octopin-Synthase der T-DNA fusioniert ist und unter der Kontrolle des B33-Promotors steht.

Ein ca. 1,7 kb HindIII-Fragment (enthaltend die

20 Saccharose-Isomerase codierende Sequenz) des in Figur 1 dargestellten Plasmids pHWG279,1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Mattes, Universität Stuttgart), das das native Gen der Saccharose-Isomerase aus *Protaminobacter rubrum* im

25 Vektor pBR322 (Bolivar et al., Gene, 2 (2) (1977), 95-113; Peden, Gene 22 (2-3) (1983), 277-280) enthält, wurde in den Vektor pBluescriptSK (Stratagene, Heidelberg) cloniert, wobei ein als pSK279,1 bezeichnetes Plasmid erhalten wurde. Zur „in fra-

30 me“-Clonierung eines vakuolären Transitpeptides des Patatin-Gens (297 bp, Rosahl et al., 1986) wurde die Signalsequenz des Patatingens mit Hilfe des PCR-Verfahrens amplifiziert und nach Spaltung der

- 24 -

Enden mit den Restriktionsenzymen ApaI und SalI in pBluescriptSK cloniert, wobei das Plasmid pSK297 erhalten wurde. Das Plasmid pSK297 wurde mit dem Restriktionsenzym SalI gespalten, die überstehenden

5 Enden wurden in glatte Enden überführt und anschließend mit dem 1,7 kb-Fragment des Plasmids pSK279,1 ligiert, dessen Enden vorher ebenfalls in glatte Enden überführt worden waren. Das erhaltene Plasmid wurde als UL5-19 bezeichnet. Zur Kontrolle

10 wurde der Übergangsbereich zwischen der Signalsequenz und der Saccharose-Isomerase codierenden Nucleotidsequenz sequenziert, um sicherzustellen, dass der Übergang korrekt war. Dabei stellte sich heraus, dass zwar der Übergang korrekt war, die Sac-

15 charose-Isomerase codierende Nucleotidsequenz des Plasmids pHWG279,1 jedoch mehrere Sequenzfehler, unter anderem ein Stop-Codon, enthielt. Deshalb wurde das HindIII-Fragment gegen ein eine fehlerfreie Saccharose-Isomerase codierendes HindIII-

20 Fragment ausgetauscht. Das erhaltene Plasmid pHWG432,3 wurde nach Transformation in Escherichia coli DH5alpha auf enzymatische Aktivität überprüft. Die mit der Signalsequenz fusionierte cDNA wurde isoliert, indem das Plasmid pHWG432,3 mit XbaI ge-

25 spalten wurde, die überstehenden Enden geglättet wurden und danach eine Spaltung mit Asp718 erfolgte. Das dabei erhaltene 2,0 kB-Fragment wurde in den binären Vektor pBinB33-Hyg cloniert, der mit SalI, wobei die überstehenden Enden anschließend

30 geglättet wurden, und Asp718 gespalten worden war, so dass eine gerichtete Clonierung möglich war. Mit dem dabei erhaltenen, als UL8-19 bezeichneten Vektor wurde der Agrobacterium tumefaciens-Stamm pGV2260 (Deblaere et al., Nucl. Acids Res., 13

- 25 -

(1985), 4777-4788) mittels Elektroporation transformiert. Die transformierten Agrobakterien wurden zur Transformation der AGPase-antisense-Linie 93 der Kartoffel (sogen. „Saccharose-Kartoffel“; Müller-Röber et al., 1990) und der Kartoffel-Wildtyp-Varietät Desiree verwendet. Dabei wurden die transgenen Pflanzen 086BK beziehungsweise 096BK erhalten.

10 Beispiel 2:

Herstellung von Vektoren, die eine Sorbit-Dehydrogenase codierende Nucleotidsequenz enthalten

Es wurde eine Reihe von Konstrukten hergestellt, die in einem binären Vektor jeweils einen in Pflanzen exprimierbaren Promotor, jeweils die Sorbitdehydrogenase codierende Nucleotidsequenz aus Gluconobacter suboxidans und jeweils das Polyadenylierungssignal der T-DNA-Octopine-Synthase enthielten. Auch in diesem Beispiel wurde die codierende Nucleotidsequenz entweder mit der Signalsequenz des Patatin-Gens fusioniert, um eine vakuoläre Lokalisation des Genprodukts zu erreichen, oder zur Expression des Genprodukts im Cytosol der Zelle ohne die vakuoläre Target-Sequenz verwendet. Als Promotoren wurden der CaMV 35 S-Promotor oder der B33-Promotor des B33-Gens der Kartoffel verwendet. Im Fall der Kartoffel wurde der binäre Vektor pBinB33-Hyg verwendet, der bereits den B33-Promotor und das Polyadenylierungssignal enthält, und im Fall der Zuckerrübe der binäre Vektor pGA492. Mit den erhaltenen Plasmiden wurden Agrobakterien transformiert. Die

- 26 -

- transformierten Agrobakterien wurden entweder zur Transformation der Kartoffel oder der Zuckerrübe verwendet. Im Folgenden wird die Konstruktion des Plasmids UL20/19 beschrieben, bei dem die Sorbit-Dehydrogenase codierende Sequenz am 5'-Ende „in frame“ mit dem Signalpeptid des Patatin-Gens und am 3'-Ende mit dem Polyadenylierungssignal der Octopin-Synthase der T-DNA fusioniert ist und unter der Kontrolle des B33-Promotors steht.
- 10 Der Vektor pSK297 (pBluescript mit 297 bp der vakuolären Targetsequenz des Patatin-Gens) wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV gespalten. Aus dem Plasmid pHWG469 (siehe Figur 2) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Mattes, Universität Stuttgart), das das native Gen der Sorbit-Dehydrogenase aus *Gluconobacter suboxidans* im Vektor pBR322 (Bolivar et al., *Gene*, 2 (2) (1977), 95-113; Peden, *Gene* 22 (2-3) (1983), 277-280) enthält, wurde ein eine Sorbit-Dehydrogenase aus *Gluconobacter suboxidans* codierendes Fragment durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen EcoRV und HindIII ausgeschnitten und nach Überführung überhängender Enden in glatte Enden gerichtet hinter die vakuoläre Targetsequenz cloniert, so dass ein durchgängiges
- 15 20 25 30 Leseraster entstand. Das Leseraster wurde an der Fusionsstelle mittels Sequenzierung überprüft. Aus dem so erhaltenen Plasmid UL19/19 wurde mittels Spaltung mit den Restriktionsenzymen Asp718 und BamHI ein 1145 bp-Fragment ausgeschnitten, das das fusionierte Protein codiert. Dieses Fragment wurde in den binären Vektor pBinB33 (Becker, *NAR*, 18 (1990), 203) cloniert. Mit dem resultierenden Plasmid UL20/19 wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-

- 27 -

Stamm pGV2260 transformiert. Die transformierten Agrobakterien wurden zur Transformation der Linien 21 und 33 der Kartoffellinie 096BK verwendet. Dabei wurden die transgenen Pflanzen 158BK beziehungsweise 159BK erhalten.

Beispiel 3:

Herstellung eines binären Vektors, der eine Mannit-Dehydrogenase codierende Nucleotidsequenz enthält

Es wurde eine Reihe von Konstrukten hergestellt, die in einem binären Vektor die Mannit-Dehydrogenase codierende Nucleotidsequenz aus *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 (Brünker et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1351 (1997), 157-167) zusammen mit jeweils einem pflanzenspezifischen Promotor und dem Polyadenylierungssignal der T-DNA-Octopin-Synthase enthielten. Auch in diesem Beispiel wurde die codierende Nucleotidsequenz entweder mit der Signalsequenz des Patatin-Gens fusioniert, um eine vakuoläre Lokalisation des Genprodukts zu erreichen, oder ohne die vakuoläre Target-Sequenz verwendet, um das Genprodukt im Cytosol der Zelle zu exprimieren. Als Promotoren wurden der CaMV 35 S-Promotor oder der B33-Promotor des B33-Gens der Kartoffel verwendet. Im Fall der Kartoffel wurde der binäre Vektor pBinB33-Hyg verwendet, der bereits den B33-Promotor und das Polyadenylierungssignal enthält, und im Fall der Zuckerrübe der binäre Vektor pGA492. Mit den erhaltenen Plasmiden wurden Agrobakterien transformiert. Die transformierten Agro-

- 28 -

bakterien wurden entweder zur Transformation der Kartoffel oder der Zuckerrübe verwendet.

Beispiel 4:

5 Transformation von Agrobacterium tumefaciens

Der DNA-Transfer in die Agrobakterien erfolgte mittels direkter Transformation nach dem Verfahren von Höfgen und Willmitzer (Nucl. Acids Res., 16 (1988), 9877). Die Plasmid-DNA transformierten Agrobakterien wurde nach dem Verfahren von Birnboim und Doly (Nucl. Acids Res., 7 (1979), 1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

15 Beispiel 5:

Transformation der Kartoffel

Die Pflanzentransformation erfolgte durch Agrobacterium tumefaciens (Stamm pGV2260 in C58C1; Deblae-re et al., Nucl. Acids Res., 13 (1985), 4777-4788) vermittelten Gentransfer nach dem in Dietze et al., Gentransfer to Plants, (1995), 24-29, beschriebenen Verfahren. Die transgenen Pflanzen wurden entweder auf Kanamycin oder Hygromycin enthaltenden Medien selektiert.

Beispiel 6:

Induktion regenerierbarer Kalli aus Blättern der Zuckerrübe

Etwa einen Monat nach der Keimung von Zuckerrüben-
5 samen im Gewächshaus wurden Versuche zur Induktion
von Kalli gemäß dem von Saunders et al. (Saunders,
J. W. und Doley, W. P., J. Plant. Physiol., 124
(1986), 473-479) beschriebenen Verfahren durchge-
führt. Dabei wurden einer jeden Pflanze junge, drei
10 bis fünf Zentimeter lange Blätter abgenommen, des-
infiziert, mit sterilem Wasser dreimal gespült und
auf sterilem Filterpapier getrocknet. Jedes Blatt
wurde anschließend in Stücke von etwa 0,25 cm² ge-
schnitten und die so erhaltenen Explantate wurden
15 in Petrischalen auf MSB1-Medium kultiviert. Nachdem
die Schalen mit einer Kunststofffolie luftdicht ab-
geschlossen worden waren, wurden sie dreißig Tage
bei 30°C im Dunklen inkubiert und anschließend in
Kulturkammern überführt. Vier bis zehn Wochen nach
20 Kulturbeginn erschienen auf oder unter den Blat-
texplantaten weiße brüchige Kalli.

Beispiel 7:

Gewinnung von Zellsuspensionen aus induzierten Kal-
25 li der Zuckerrübe

Vier bis sechs Wochen nach ihrem Erscheinen wurden
die Kalli entnommen und in 250 ml-Erlenmeyerkolben,
die mit Folie verschlossen worden waren, in 100 ml
flüssigem MSB1-Medium kultiviert. Die Erlenmeyer-
30 kolben wurden auf einem Rotationsschüttler bei etwa

- 30 -

200 U/min geschüttelt. Nach etwa zwei bis drei Wochen wurde eine Zellsuspension erhalten.

Beispiel 8:

5 Transformation von Zellsuspensionen und jungen Kal-
li der Zuckerrübe

Zellsuspension

Die Transformation wurde mit Zellsuspensionen nach etwa dreiwöchigem Kultivieren durchgeführt. Zu
10 10 ml Suspensionsmedium wurden 10 ml frisches MSB1-Medium zugegeben. Die so verdünnte Suspension wurde auf vier Petrischalen verteilt.

Aus Stammkulturen von *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen, die mit den erstellten Binärvektoren
15 transformiert worden waren, wurden 50 µl entnommen und in 2 ml LB-Medium, das Rifampicin und Tetracyclin enthielt, kultiviert. Die Kulturen wurden zwei Tage mit 200 U/min bei 30° C gerührt. Dieser Stamm wurde in frisches Medium umgesetzt und unter den
20 vorstehend beschriebenen Bedingungen die Nacht über kultiviert.

Die Infektion der Pflanzenzellen erfolgte, indem 50 µl eines jeden *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes einer der die entsprechenden Rübenzellen enthal-
25 den Petrischalen zugesetzt wurden. Die Rübenzellen und die Bakterien wurden drei Tage lang in einer Kulturkammer in der Dunkelheit kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien von den Pflanzenzellen entfernt, indem zunächst mit MSB1 und

- 31 -

600 mg/l Cefotaxim und dann mit MSB1 plus 300 mg/l Cefotaxim gewaschen wurde. Die so gewaschenen Rübenzellen wurden in Petrischalen auf einem Blatt sterilen Whatman-Papier kultiviert, das auf Kanamycinhaltigem MSB1-Medium plus 300mg/l Cefotaxim lag. Die Schalen wurden mit Kunststofffolie luftdicht verschlossen und fünfzehn Tage in der Kulturkammer inkubiert. Drei bis acht Wochen danach erschienen weiße Kalli auf einer Schicht abgestorbener Zellen.

10 Dispersion neu induzierter Kalli

Es wurden junge, aus Blattexplantaten frisch induzierte Kalli transformiert. Dabei wurden Kalli verwendet, die nach zwei bis sechs Wochen auf Blättern gerade erschienen waren. Diese Kalli wurden in sterilen Kunststoffröhrchen in flüssigem MSB1-Medium dispergiert und dem gleichen Transformationsverfahren wie die Zellsuspensionen unterworfen.

Beispiel 9:

20 Regeneration von Zuckerrüben-Pflanzen aus transformierten Kalli

Nachdem die transformierten Kalli zunächst einen Monat auf MSB1 und Cefotaxim oder MSB1 und Cefotaxim und Kanamycin kultiviert worden waren, erfolgte die weitere Kultivierung der transformierten Kalli auf MSB1-Medium.

Nach einer bestimmten Zeit entwickelten sich aus bestimmten Kalli Sprossen und/oder Embryonen. Sobald die Sprossen mit der Entwicklung von Blättern

- 32 -

begonnen hatten, wurden diese auf MS-Medium, das 1 mg/l Naphtalinessigsäure enthielt, eingewurzelt. Nach zwei bis sechs Wochen erschienen Wurzeln. Nach der Entwicklung von Wurzeln wurden die Pflanzen im Gewächshaus in Humuserde aklimatisiert. Nach weiteren drei Monaten hatten sich vollständige Pflanzen entwickelt.

Beispiel 10:

10 Nachweis des gebildeten Mannit-Dehydrogenase-, Sorbit-Dehydrogenase- und Saccharose-Isomerase-Gens in transformiertem Gewebe

Die Vorselektion von transformierten Pflanzen erfolgte auf Kanamycin beziehungsweise Hygromycin enthaltenden Medien. Zum Nachweis der Transgene wurde zunächst genomische DNA aus den entsprechenden Geweben (Kartoffelknollen oder Zuckerrüben-Speicherwurzel) isoliert. Jeweils 30 ng genomische DNA wurde als Template für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saki et al., Science, 239 (1988), 487-491) verwendet. Als Primer dienten genspezifische Sonden aus dem 5'- und 3'-Bereich der Saccharose-Isomerase aus *Protaminobacter rubrum*, der Sorbit-Dehydrogenase aus *Gluconobacter suboxidans* und der Mannit-Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens*. Die Reaktionen wurden jeweils in einer Lösung mit einem Gesamtvolumen von 50 µl, enthaltend 1 µM der 3'- und 5'-Primer; 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl und 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,4, mit 1 E Tag-Polymerase (Gibco-BRL) durchgeführt. Die PCR-Ansätze wurden jeweils

- 33 -

40 Zyklen mit 1-minütiger Denaturierung bei 95°C,
1-minütiger Primeranlagerung bei 65°C und
2,5-minütiger Synthese bei 72°C unterworfen, wobei
eine 10-minütige abschließende Synthese zur Ketten-
5 Vervollständigung die gesamte Reaktion beendete.
Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mittels
Gelelektrophorese, wobei das dem jeweiligen Trans-
gen entsprechende PCR-Produkt über die Fragment-
größe bestimmt wurde. Nach Subclonierung und par-
10 tieller Sequenzierung der PCR-Produkte konnten die
Transgene eindeutig identifiziert werden.

Beispiel 11:

15 Nachweis der Saccharose-Isomerase-Aktivität in transformiertem Gewebe

Der Nachweis der Saccharose-Isomerase-Aktivität in
transformierten Kartoffelknollen wurde wie folgt
durchgeführt. Kartoffelknollen transgener Kartof-
felpflanzen und der als Kontrolle verwendeten Wild-
20 typ-Varietät Desiree wurden zerkleinert und jeweils
2 bis 5 g des zerkleinerten Materials wurden nach
Zugabe von 50 ml kochendem Wasser in einem Omni-
Mixer 2 min homogenisiert und anschließend 15 min
in einem Wasserbad bei 95°C erhitzt. Der Nachweis
25 von Isomaltulose erfolgt nach Zentrifugation und
Verdünnung des Überstandes mit Hilfe des HPAEC-
Verfahrens. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in
Tabelle 1 dargestellt.

- 34 -

Tabelle 1: Nachweis von Isomaltulose in transgenen Kartoffelpflanzen

g Isomaltulose/kg Frischgewicht		
5	Desiree 1	0,0
	Desiree 2	0,0
	Desiree 3	0,0
	transgene Probe 1	23,6
	transgene Probe 2	14,0
10	transgene Probe 3	44,8
	transgene Probe 4	31,4
	transgene Probe 5	38,5

15

Ansprüche

- 5 1. Transgene Pflanze, die in mindestens einer ihrer
Zellen aus in der Pflanze gebildeter Saccharose
Isomaltulose erzeugen kann, wobei die Pflanze in
der mindestens einen Zelle eine stabil integrierte
und in ihr exprimierbare Nucleotidsequenz enthält,
10 die die Aktivität einer Saccharose-Isomerase co-
diert.
2. Transgene Pflanze nach Anspruch 1, **dadurch ge-
kennzeichnet, dass** diese in der mindestens einen
Zelle eine zusätzliche stabil integrierte und
15 exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Ak-
tivität einer Sorbit-Dehydrogenase codiert und die
die Zelle in die Lage versetzt, aus der gebildeten
Isomaltulose 6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-sorbit (1,6-
GPS) zu erzeugen.
- 20 3. Transgene Pflanze nach Anspruch 1 oder 2, **da-
durch gekennzeichnet, dass** diese in der mindestens
einen Zelle eine zusätzliche stabil integrierte und
exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Ak-
tivität einer Mannit-Dehydrogenase codiert und die
25 die Zelle in die Lage versetzt, aus der gebildeten
Isomaltulose 1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-mannit (1,1-
GPM) zu erzeugen.
4. Transgene Pflanze nach Anspruch 1, **dadurch ge-
kennzeichnet, dass** diese in der mindestens einen

- 36 -

Zelle eine zusätzliche stabil integrierte und exprimierbare Nucleotidsequenz, die die Aktivität einer Sorbit-Dehydrogenase codiert, und eine zusätzliche stabil integrierte und exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer Mannit-Dehydrogenase codiert, wobei diese Nucleotidsequenzen die Zelle in die Lage versetzen, aus der gebildeten Isomaltulose 1-O- α -D-Glucopyranosyl-D-mannit und 6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-sorbit zu erzeugen.

5. Transgene Pflanze, die in mindestens einer ihrer Zellen eine stabil integrierte und exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer Sorbit-Dehydrogenase codiert.

15 6. Transgene Pflanze, die in mindestens einer ihrer Zellen eine stabil integrierte und exprimierbare Nucleotidsequenz enthält, die die Aktivität einer Mannit-Dehydrogenase codiert.

20 7. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie eine Kartoffel ist.

8. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie eine Zuckerrübe ist.

25 9. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Nucleotidsequenz in einem Pflanzen-Vektor enthalten ist.

- 37 -

10. Transgene Pflanze nach Anspruch 9, wobei die codierende Nucleotidsequenz eine cDNA oder eine genomische DNA-Sequenz ist.
11. Transgene Pflanze nach Anspruch 10, wobei die
5 Saccharose-Isomerase codierende Nucleotidsequenz aus einem Mikroorganismus, insbesondere aus einem Mikroorganismus der Gattung Protaminobacter, Erwina, Serratia, Leuconostoc, Pseudomonas, Agrobacterium oder Klebsiella, die Sorbit-Dehydrogenasen codierende Nucleotidsequenz aus einem Mikroorganis-
10 mus, insbesondere aus einem Mikroorganismus der Gattung Gluconobacter, und die Mannit-Dehydrogenase aus einem Mikroorganismus, insbesondere aus einem Mikroorganismus der Gattung Pseudomonase, erhältlich
15 lich ist.
12. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die codierende Nucleotidsequenz unter der funktionellen Kontrolle mindestens eines regulatorischen Elementes steht, das die Transkription
20 in pflanzlichen Zellen gewährleistet.
13. Transgene Pflanze nach Anspruch 12, wobei das mindestens eine regulatorische Element ein Promotor, insbesondere ein pflanzenspezifischer Promotor ist.
- 25 14. Transgene Pflanze nach Anspruch 13, wobei der Promotor ein gewebe- oder organspezifischer, vorzugsweise ein speicherorganspezifischer Promotor ist.
15. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1
30 bis 14, wobei die codierende Nucleotidsequenz im

- 38 -

Leseraster entweder an eine Signalsequenz fusioniert ist, welche ein Signalpeptid codiert, das den Transport des Proteins mit der Aktivität einer Saccharose-Isomerase, des Proteins mit der Aktivität einer Sorbit-Dehydrogenase oder des Proteins mit der Aktivität einer Mannit-Dehydrogenase zu einem bestimmten Zellkompartiment oder einer bestimmten Zellorganelle gewährleistet, oder nicht an eine Signalsequenz fusioniert ist, so daß das Protein mit der Aktivität einer Saccharose-Isomerase, das Protein mit der Aktivität einer Sorbit-Dehydrogenase oder das Protein mit der Aktivität einer Mannit-Dehydrogenase im Cytosol lokalisiert ist.

16. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die codierende Nucleotidsequenz funktionell mit Terminations- und/oder Polyadenylierungssignalen verbunden ist.

17. Vermehrungs- und/oder Erntematerial einer Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 16.

18. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze nach Anspruch 1, umfassend

a) die Transformation einer oder mehrerer Pflanzenzellen mit einer die Aktivität einer Saccharose-Isomerase codierenden Nucleotidsequenz,

b) die Integration der Nucleotidsequenz in das Genom der transformierten Zelle(n) und

c) die Regeneration von Pflanzen, die aus Saccharose Isomaltulose erzeugen.

19. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend

- a) die Transformation einer oder mehrerer Pflanzenzellen mit einer oder mehreren Nucleotidsequenz(en)
5 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer die Aktivität einer Saccharose-Isomerase codierenden Nucleotidsequenz, einer die Aktivität einer Sorbit-Dehydrogenase codierenden Nucleotidsequenz und einer die Aktivität einer Mannit-Dehydrogenase codierenden Nucleotidsequenz,
10
b) die Integration der Nucleotidsequenz(en) in das Genom der transformierten Zelle(n) und
c) die Regeneration von Pflanzen, die Sorbit-Dehydrogenase, Mannit-Dehydrogenase- und/oder Saccharose-Isomerase erzeugen.
15

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Transformation eine Cotransformation der jeweils eingesetzten Nucleotidsequenzen ist.

21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die zu transformierenden Zellen transgene Zellen sind, die mindestens eine stabil integrierte Nucleotidsequenz enthalten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer die Aktivität einer Saccharose-Isomerase codierenden Nucleotidsequenz, einer die Aktivität einer Sorbit-Dehydrogenase codierenden Nucleotidsequenz und einer die Aktivität einer Mannit-Dehydrogenase codierenden Nucleotidsequenz.
20
25

- 40 -

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, **dadurch gekennzeichnet, dass** die transformierte(n) Nucleotidsequenz(en) in einem Pflanzenvektor enthalten sind.

5 23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die codierende(n) Nucleotidsequenz(en) eine cDNA oder eine genomische DNA Sequenz ist (sind).

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die Saccharose-Isomerase codierende Nucleotidsequenz aus einem
10 Mikroorganismus, insbesondere aus einem Mikroorganismus der Gattung Protaminobacter, Erwinia, Serratia, Leuconostoc, Pseudomonas, Agrobacterium oder Klebsiella, die Sorbit-Dehydrogenase codierende Nucleotidsequenz aus einem Mikroorganismus, insbe-
15 sondere aus einem Mikroorganismus der Gattung Gluconobacter, und die Mannit-Dehydrogenase codierende Nucleotidsequenz aus einem Mikroorganismus, insbesondere einem Mikroorganismus der Gattung Pseudomonas, erhältlich ist.

20 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 24 wobei die codierende(n) Nucleotidsequenz(en) jeweils unter der funktionellen Kontrolle mindestens eines regulatorischen Elementes steht/stehen, das die Transkription in pflanzlichen Zellen gewähr-
25 leistet.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das mindestens eine regulatorische Element ein Promotor, insbesondere ein pflanzenspezifischer Promotor ist.

- 41 -

27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei der Promotor ein gewebe- oder organspezifischer, vorzugsweise ein speicherorganspezifischer Promotor ist.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 27,
5 wobei die codierende(n) Nucleotidsequenz(en) entweder im Leseraster an eine Signalsequenz fusioniert ist (sind), welche ein Signalpeptid codiert, das den Transport des codierten Proteins zu einem bestimmten Zellkompartiment oder einer bestimmten
10 Zellorganelle gewährleistet, oder nicht an eine Signalsequenz fusioniert ist, so daß das codierte Protein im Cytosol lokalisiert ist.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 28,
wobei die codierende(n) Nucleotidsequenz(en) funktionell mit Terminations- und/oder Polyadenylierungssignalen verbunden ist (sind).
15

1/2

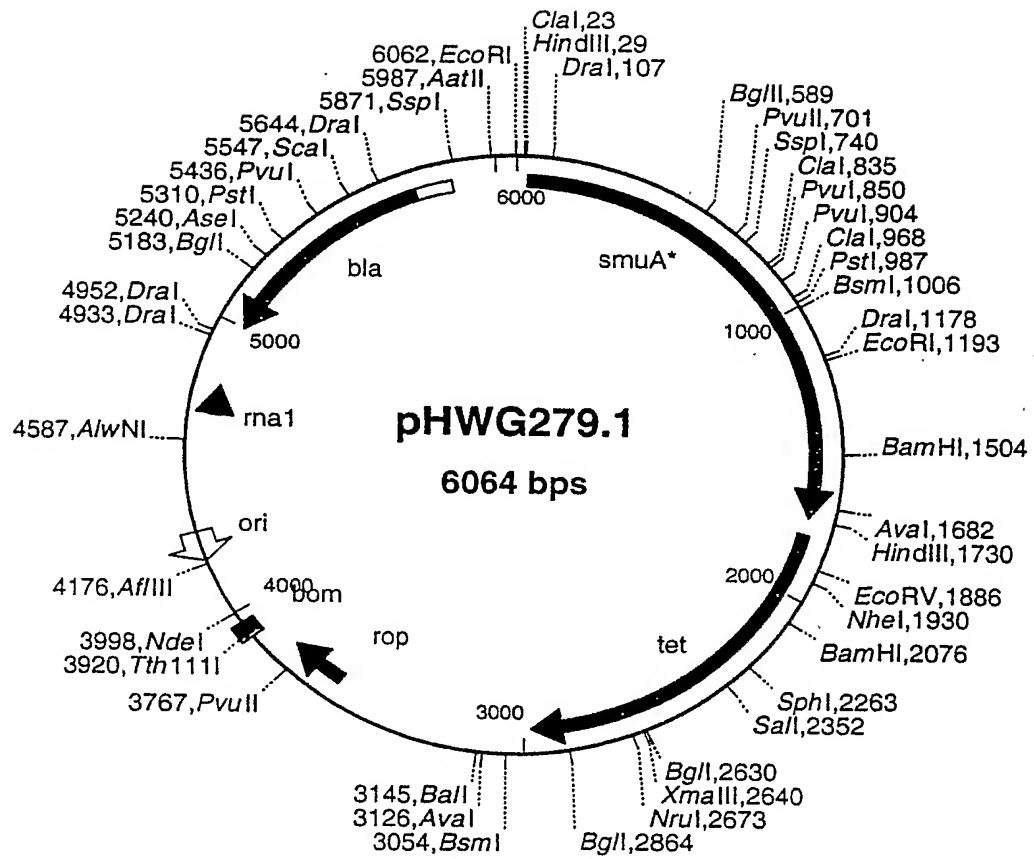


Fig. 1

2/2

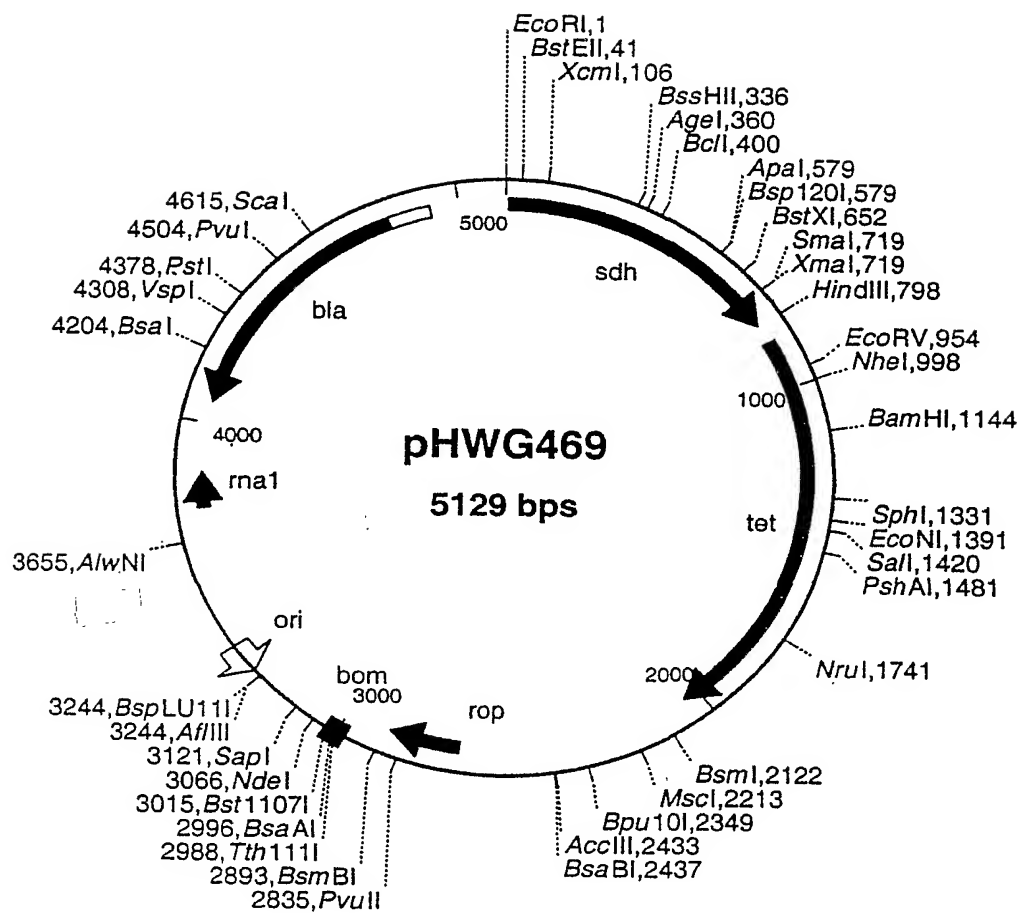


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/08055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 20047 A (KLEIN KATHRIN ;KUNZ MARKWART (DE); MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG) 27 July 1995 (1995-07-27) cited in the application Seite 8 , Absatz 3; Seite 9 , Absatz 2 ---	1,9-13, 15-18, 22-26, 28,29
A	BRUENKER PETER ET AL: "Cloning, nucleotide sequence and expression of a mannitol dehydrogenase gene from Pseudomonas fluorescens DSM 50106 in Escherichia coli." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1351, no. 1-2, 1997, pages 157-167, XP001034763 ISSN: 0006-3002 cited in the application the whole document --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2001

Date of mailing of the international search report

04/12/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/08055

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHOI E-S ET AL: "PURIFICATION OF A MEMBRANE-BOUND SORBITOL DEHYDROGENASE FROM GLUCONOBACTER SUBOXYDANS" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, AMSTERDAM, NL, vol. 125, no. 1, 1995, pages 45-49, XP000852950 ISSN: 0378-1097 the whole document ----	
E	WO 01 59135 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16 August 2001 (2001-08-16) the whole document ----	1,9-13, 15-18, 25,26, 28,29
E	WO 01 59136 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16 August 2001 (2001-08-16) the whole document ----	1,7-18, 22-29
E	US 6 274 379 B1 (FAMODU LAYO O ET AL) 14 August 2001 (2001-08-14) the whole document -----	5,9,10, 12,13, 15-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/08055

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9520047	A	27-07-1995	DE	4414185 C1	07-09-1995
			AU	1155495 A	27-07-1995
			AU	688848 B2	19-03-1998
			AU	1534995 A	08-08-1995
			BR	9500271 A	17-10-1995
			CA	2140613 A1	20-07-1995
			DE	4447471 A1	31-08-1995
			DE	4447472 A1	14-09-1995
			WO	9520047 A2	27-07-1995
			EP	0740706 A1	06-11-1996
			FI	950187 A	20-07-1995
			FI	962891 A	18-07-1996
			JP	7250693 A	03-10-1995
			NO	950194 A	20-07-1995
			US	5786140 A	28-07-1998
			US	5985622 A	16-11-1999
WO 0159135	A	16-08-2001	DE	10045113 A1	16-08-2001
			WO	0159135 A1	16-08-2001
WO 0159136	A	16-08-2001	DE	10006462 A1	13-09-2001
			WO	0159136 A1	16-08-2001
US 6274379	B1	14-08-2001	NONE		

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/82 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 20047 A (KLEIN KATHRIN ;KUNZ MARKWART (DE); MATTES RALF (DE); SUEDZUCKER AG) 27. Juli 1995 (1995-07-27) in der Anmeldung erwähnt Seite 8 , Absatz 3; Seite 9 , Absatz 2 ---	1,9-13, 15-18, 22-26, 28,29
A	BRUENKER PETER ET AL: "Cloning, nucleotide sequence and expression of a mannitol dehydrogenase gene from Pseudomonas fluorescens DSM 50106 in Escherichia coli." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1351, Nr. 1-2, 1997, Seiten 157-167, XP001034763 ISSN: 0006-3002 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. November 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/12/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>CHOI E-S ET AL: "PURIFICATION OF A MEMBRANE-BOUND SORBITOL DEHYDROGENASE FROM GLUCONOBACTER SUBOXYDANS" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 125, Nr. 1, 1995, Seiten 45-49, XP000852950 ISSN: 0378-1097 das ganze Dokument</p> <p>----</p>	
E	<p>WO 01 59135 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16. August 2001 (2001-08-16) das ganze Dokument</p> <p>----</p>	<p>1,9-13, 15-18, 25,26, 28,29</p>
E	<p>WO 01 59136 A (IPK INST FUER PFLANZENGENETIK ;SONNEWALD UWE (DE); BOERNKE FREDERI) 16. August 2001 (2001-08-16) das ganze Dokument</p> <p>----</p>	<p>1,7-18, 22-29</p>
E	<p>US 6 274 379 B1 (FAMODU LAYO O ET AL) 14. August 2001 (2001-08-14) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	<p>5,9,10, 12,13, 15-17</p>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/08055

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9520047	A	27-07-1995	DE 4414185 C1 07-09-1995
			AU 1155495 A 27-07-1995
			AU 688848 B2 19-03-1998
			AU 1534995 A 08-08-1995
			BR 9500271 A 17-10-1995
			CA 2140613 A1 20-07-1995
			DE 4447471 A1 31-08-1995
			DE 4447472 A1 14-09-1995
			WO 9520047 A2 27-07-1995
			EP 0740706 A1 06-11-1996
			FI 950187 A 20-07-1995
			FI 962891 A 18-07-1996
			JP 7250693 A 03-10-1995
			NO 950194 A 20-07-1995
			US 5786140 A 28-07-1998
			US 5985622 A 16-11-1999
WO 0159135	A	16-08-2001	DE 10045113 A1 16-08-2001
			WO 0159135 A1 16-08-2001
WO 0159136	A	16-08-2001	DE 10006462 A1 13-09-2001
			WO 0159136 A1 16-08-2001
US 6274379	B1	14-08-2001	KEINE